

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



<p>(51) 国際特許分類6 C12P 17/10 // (C12P 17/10, C12R 1:645) (C12P 17/10, C12R 1:265) (C12P 17/10, C12R 1:84) (C12P 17/10, C12R 1:78)</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO98/23768</p> <p>(43) 国際公開日 1998年6月4日 (04.06.98)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/04299</p> <p>(22) 国際出願日 1997年11月26日 (26.11.97)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平8/331467 1996年11月26日 (26.11.96) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 鐘淵化学工業株式会社(KANEKA CORPORATION)[JP/JP] 〒530 大阪府大阪市北区中之島三丁目2番4号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 八上原良彦(YASOHARA, Yoshihiko)[JP/JP] 〒670 兵庫県姫路市日出町3-7-2-605 Hyogo, (JP) 長谷川淳三(HASEGAWA, Junzo)[JP/JP] 〒674 兵庫県明石市大久保町高丘2丁目13-4 Hyogo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁護士 安富康男, 外(YASUTOMI, Yasuo et al.) 〒532 大阪府大阪市淀川区西中島5丁目14番22号 リクルート新大阪ビル4階 Osaka, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 CN, CZ, HU, IL, KR, SG, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54) Title: PROCESS FOR THE PREPARATION OF OPTICALLY ACTIVE N-BENZYL-3-PYRROLIDINOL</p> <p>(54) 発明の名称 光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A process for preparing optically active N-benzyl-3-pyrrolidinol efficiently by reducing N-benzyl-3-pyrrolidinone stereoselectively through an enzymatic reaction. The process is one which comprises the step of treating N-benzyl-3-pyrrolidinone with cells of a microorganism, a culture thereof or a product of treatment thereof to form a reaction fluid and the step of recovering optically active N-benzyl-3-pyrrolidinol from the fluid, and wherein the microorganism is one belonging to the genus Depodascus, Debaryomyces, Cryptococcus, Pichia, Rhodosporidium, Trichosporon, Micrococcus, Komagataella, Ogataea or Zygosaccharomyces.</p>		

(57) 要約

本発明は、N-ベンジル-3-ピロリジノンを立体選択的に還元する酵素反応によるより効率的な光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法を提供すること。

本発明は、N-ベンジル-3-ピロリジノンに、微生物の菌体、培養物又はそれらの処理物を作用させて反応液を得る工程、及び、上記反応液から、光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールを採取する工程からなる光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法であって、上記微生物が、デポダスカス (*Depodascus*) 属、デバリオマイセス (*Debaryomyces*) 属、クリプトコッカス (*Cryptococcus*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、ロードスポリディウム (*Rhodospiridium*) 属、トリコスポロン (*Trichosporon*) 属、ミクロコッカス (*Micrococcus*) 属、コマガタエラ (*Komagataella*) 属、オガタエア (*Ogataea*) 属、又は、チゴサッカロマイセス (*Zygosaccharomyces*) 属に属する微生物である光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を特定するために使用されるコード (参考情報)

AC	アルバニア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SN	セネガル
AD	アンドラ	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SO	ソマリア
AE	アラブ首長国連邦	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	TD	チャド
AG	アンティグア・バーブーダ	GG	ガナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
AI	アングラ	GH	ガーナ	MD	モルドバ	TT	トリニダード・トバゴ
AL	アルバニア	GM	ギニア	MG	マダガスカル	TR	トルコ
AM	アルメニア	MN	モンゴル	MK	マケドニア	UA	ウクライナ
AN	オランダ	NW	ネーデルラント	ML	マリ	UG	ウガンダ
AO	アンゴラ	GR	ギリシャ	MN	モンゴル	US	アメリカ合衆国
AR	アルゼンチン	DE	ドイツ	MR	モーリタニア	UY	ウルグアイ
AT	オーストリア	IE	アイルランド	MX	メキシコ	VN	ベトナム
AU	オーストラリア	IL	イスラエル	NE	ニジェール	ZW	ジンバブエ
AW	アールバ	IT	イタリア	NL	オランダ		
AX	アレクサンドリア	JP	日本	NO	ノルウェー		
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
BB	バハマ	KR	韓国	PL	ポーランド		
BD	バングラデシュ	KG	キルギス	PT	ポルトガル		
BE	ベルギー	KN	セント・キッツ・ネイビス	RO	ルーマニア		
BF	ブルキナファソ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア		
BG	ブルガリア	LC	セント・ルシア	SE	スウェーデン		
BH	バーレーン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		
BI	ブルンジ	LR	リベリア	SI	スロベニア		
BJ	ベナン	LS	レソト	SK	スロバキア		
BK	バングラ			SL	シエラレオネ		
BL	ブルル						
BM	バハマ						
BN	ブルネイ						
BO	ボリビア						
BR	ブラジル						
BS	バハマ						
BT	ブータン						
BV	ブーヴィエ						
BW	ボツワナ						
BY	ベラルーシ						
BZ	ベリーズ						
CA	カナダ						
CC	ココス (キリング) 諸島						
CD	コンゴ民主共和国						
CE	セネガル						
CF	中央アフリカ共和国						
CG	コンゴ共和国						
CH	スイス						
CI	コートジボワール						
CK	クック						
CL	チリ						
CM	コンゴ民主共和国						
CN	中国						
CO	コロンビア						
CR	コスタリカ						
CU	キューバ						
CV	カボベルデ						
CY	キプロス						
CZ	チェコ						
DE	ドイツ						
DF	ドイツ						
DG	ドイツ						
DH	ドイツ						
DI	ドイツ						
DJ	ジブチ						
DK	デンマーク						
DL	ドイツ						
DM	ドミニカ						
DN	ドイツ						
DO	ドミニカ						
DP	ドイツ						
DQ	ドイツ						
DR	ドイツ						
DS	ドイツ						
DT	ドイツ						
DU	ドイツ						
DV	ドイツ						
DW	ドイツ						
DX	ドイツ						
DY	ドイツ						
DZ	ドイツ						

明細書

光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法

技術分野

本発明は、 β -ラクタム系抗生物質やジヒドロピリジン系化合物等の医薬品の合成中間体として有用な光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法に関する。

背景技術

光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールは、医薬品の合成中間体として有用である。光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法としては、光学活性な化合物から合成する方法や、プロキラルな化合物から出発して不斉合成又は光学分割する方法等が知られている。このような方法として、特開平6-141876号公報には、N-ベンジル-3-ピロリジノン⁽¹⁾を立体選択的に還元する活性を有する酵素の存在下、このN-ベンジル-3-ピロリジノンを立体選択的に還元して光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールを製造する方法が開示されている。しかしながら、この方法は、工業的な培養やその後の操作が困難なカビを酵素源として使用しており、また、その基質仕込濃度及び基質から生成物への転換率が低く、実用に耐えるものではなかった。

発明の要約

本発明は、上記に鑑み、N-ベンジル-3-ピロリジノンを立体選択的に還元する酵素反応によるより効率的な光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法を提供することを目的とするものである。

本発明は、N-ベンジル-3-ピロリジノンに、微生物の菌体、培養物又はそれらの処理物を作用させて反応液を得る工程、及び、上記反応液から、光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールを採取する工程からなる光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法であって、上記微生物が、デボグスカス（D

epodascus) 属、デバリオマイセス (Debaryomyces) 属、クリプトコッカス (Cryptococcus) 属、ピキア (Pichia) 属、ロードスポリディウム (Rhodosporidium) 属、トリコスポロン (Trichosporon) 属、マイクロコッカス (Micrococcus) 属、コマガタエラ (Komagataella) 属、オガタエア (Ogataea) 属、又は、チゴサッカロマイセス (Zygosaccharomyces) 属に属する微生物である光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法である。

発明の詳細な開示

以下に本発明を詳述する。

本発明においては、まず、基質であるN-ベンジル-3-ピロリジノンに、微生物の菌体、培養物又はそれらの処理物を作用させて反応液を得る。

上記N-ベンジル-3-ピロリジノンは、特開昭54-16466号公報に開示されている方法で合成することができる。すなわち、ベンジルアミンとアクリル酸エチルとをマイケル付加させることにより得られる β -アラニン誘導体に、塩基の存在下クロロ酢酸エチルを反応させる。得られる化合物を金属ナトリウム存在下で環化させ、N-ベンジル-4-カルボエトキシ-3-ピロリドンを得る。このものを塩酸により脱炭酸してN-ベンジル-3-ピロリジノンを得ることができる。

本発明においては、上記微生物として、デポダスカス (Depodascus) 属、デバリオマイセス (Debaryomyces) 属、クリプトコッカス (Cryptococcus) 属、ピキア (Pichia) 属、ロードスポリディウム (Rhodosporidium) 属、トリコスポロン (Trichosporon) 属、マイクロコッカス (Micrococcus) 属、コマガタエラ (Komagataella) 属、オガタエア (Ogataea) 属、又は、チゴサッカロマイセス (Zygosaccharomyces) 属に属する微生物を用いる。これらの微生物は、上記N-ベンジル-3-ピロリジノンの3位のカルボニル基を立体選択的に還元する。

上記微生物の具体例としては特に限定されず、例えば、デポダスカス・テトラスペルマ (Depodascus tetrasperma) CBS 765.70、デバリオマイセス・ハンセニー・バラエティ・ハンセニー (Debaryomyces hansenii var. hansenii) IFO 0728、クリプトコッカス・アルビダス・バラエティ・アルビダス (Cryptococcus albidus var. albidus) IFO 0378、ピキア・メンブランファシエンス (Pichia membranaefaciens) IFO 0189、ロードスポリディウム・トルコイデス (Rhodosporidium toruloides) IFO 0413、トリコスポロン・ファーメンタンス (Trichosporon fermentans) ATCC 10675、ミクロコッカス・ルテウス (Micrococcus luteus) IFO 13867、コマガタエラ・パストリス (Komagataella pastoris) IFO 0948、オガタエア・ポリモルファ (Ogataea polymorpha) IFO 1476、チゴサッカロマイセス・バイリイ (Zygosaccharomyces baillii) IFO 0519等を挙げることができる。

これらの微生物は一般に、入手又は購入が容易な保存株から得ることができる。また、自然界から分離することもできる。なお、これらの微生物に変異を生じさせてより本反応に有利な性質を有する菌株を得ることもできる。また、これら微生物から組換えDNA、細胞融合等の遺伝子工学、生物工学的手法により誘導されるものであってもよい。

上記微生物は、栄養成分を含む培地を使用して培養することができる。上記培地としては、通常、寒天培地等の固体培地や液体培地等が用いられる。上記微生物を大量に培養する場合には、液体培地が好適に用いられる。上記培地には、グルコース、シュークロース、マルトース等の糖類、乳酸、酢酸、クエン酸等の有機酸類、エタノール、グリセリン等のアルコール類、又は、これらの混合物等の炭素源や、硫酸アンモニウム、りん酸アンモニウム、尿素、酵母エキス、肉エキス、ペプトン等の窒素源を混合することができる。更に、その他の無機塩、ビタミン類等の栄養源を適宜混合することもできる。

上記微生物の培養は通常一般の条件により行うことができ、例えば、pH 4.0～9.5、温度範囲 20～45℃にて、好氣的に 10～96 時間培養する。

上記 N-ベンジル-3-ピロリジノンに上記微生物を作用させる場合においては、通常、上記微生物の培養液をそのまま反応に使用することもできるが、上記培養液中の成分が反応に悪影響を与える場合には、上記培養液を遠心分離等により処理して得られる懸濁液を使用することが好ましい。

上記菌体の処理物としては特に限定されず、例えば、菌体の乾燥物、界面活性剤又は有機溶媒処理物、溶菌酵素処理物、固定化菌体又は菌体からの抽出酵素標品等を挙げるができる。

上記培養物の処理物としては特に限定されず、例えば、培養物の濃縮物、乾燥物、界面活性剤又は有機溶媒処理物、溶菌酵素処理物等を挙げるができる。更に、培養菌体、培養物より酵素を精製し、これを使用してもよい。

上記 N-ベンジル-3-ピロリジノンに上記微生物の菌体、培養物又はそれらの処理物を作用させて反応させる際には、上記 N-ベンジル-3-ピロリジノンを反応初期に一括して添加してもよく、分割して添加してもよい。また、この場合の反応温度は、通常 15～50℃、好ましくは、20～40℃であり、pH は、2.5～9.0 である。

反応液中の上記菌体の量は上記菌体の反応の接触能力に応じて適宜使用すればよい。また、基質濃度は、0.01～50% (W/V) が好ましい。より好ましくは、0.1～20% (W/V) である。

反応は、通常、振盪又は通気攪拌しながら行なう。反応時間は基質濃度、微生物量及びその他の反応条件によって適宜決定される。通常、2～168 時間で反応が終了するように各条件を設定することが好ましい。上記反応を促進させるために、反応液にグルコース等のエネルギー源を 1～5% の割合で加えると優れた結果が得られるので好ましい。

また、一般に生物学的方法による還元反応に必要とされている還元型ニコチンアミド・アデニンジヌクレオチド (NADH)、還元型ニコチンアミド・アデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) 等の補酵素成物を添加することにより、反応を促進させることができる。具体的には、反応系にこれらを添加してもよく

、NADH、NADPH等を生成する反応システムを反応系に添加してもよい。例えば、ギ酸脱水素酵素がギ酸から二酸化炭素と水とを生成する際にNADからNADHを生成する反応や、グルコース脱水素酵素がグルコースからグルコノラクトンを生成する際にNADからNADH又はNADPからNADPHを生成する反応を利用することができる。また、トリトン（半井化学社製）、スパン（関東化学社製）、ツイーン（半井化学社製）等の界面活性剤を添加してもよい。

本発明においては、次に、反応液から、生成物である光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールを採取する。

上記N-ベンジル-3-ピロリジノールを反応液から採取する方法としては特に限定されず、一般的な単離法等を採用することができる。例えば、反応液に酢酸エチル等の有機溶媒を加えて抽出し、得られる抽出液を無水硫酸ナトリウム等で脱水後、減圧下で有機溶媒を除去することにより、光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの粗精製物を得ることができる。この場合においては、抽出効率を高めるために、炭酸水素ナトリウム、塩化ナトリウム等の塩類を加えてもよい。また、必要に応じて、この粗精製物を、蒸留、シリカゲルカラムクロマトグラフィー等により更に純粋な光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールとすることもできる。

発明を実施するための最良の形態

以下に実施例を掲げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

実施例 1

下記の組成からなる液体培地を調製し、大型試験管に5 mlずつ分注して、30℃で20分間蒸気殺菌を行った。

培地組成：

グルコース	4	%
酵母エキス	0.3	%
KH ₂ PO ₄	0.1	%

$(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$	0.65	%
NaCl	0.1	%
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.8	%
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.06	%
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.09	%
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.005	%
$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 6\text{H}_2\text{O}$	0.01	%

水道水

pH 7.0

これらの液体培地に表2に示す微生物を1白金耳接種して、30℃で24～72時間振盪培養した。次に、各培養液を遠心分離にかけて菌体を集め、水洗後、各菌体を100mMりん酸緩衝液(pH 6.5) 1mlに懸濁させて下記の反応液成分として使用した。

反応液組成：

(1) 上記菌体懸濁液	1 ml
(2) グルコース	20 mg
(3) N-ベンジル-3-ピロリジノン	10 mg

上記の(1)～(3)を試験管に分注して混合し、振盪しながら30℃で20時間反応させた。反応後、各反応液に3.5mlの酢酸エチルを加えてよく混合した。この有機層の一部をガスクロマトグラフィーに供し、N-ベンジル-3-ピロリジノール量を分析した。また、その光学純度をHPLCにより測定した。

ガスクロマトグラフィー測定条件：カラム：Unipor t B、10%PEG-20M、4.0mm ID×1.0m、カラム温度：200℃、キャリアーガス：窒素、検出：FID

HPLC分析条件：カラム：Chiralcel OB (タイセル化学工業社製)、溶離液：n-ヘキサン/イソプロパノール/ジエチルアミン=99/1/0.1、検出：254nm、流速：1ml/分、溶出時間：(R)体6.1分、(S)体7.9分

表1に生成物への変換率と生成物の光学純度をまとめた。

表 1

菌株名	変換率 (%)	光学純度 (%ee)
デポダスカス・テトラスペルマ (<i>Depodascus tetrasperma</i>) CBS 765.70	10	(S) 97
デバリオマイセス・ハンセニー IFO 0728 (<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i>)	7	(S) 84
クリプトコッカス・アルビダス IFO 0378 (<i>Cryptococcus albidus</i> var. <i>albidus</i>)	34	(S) 100
ピキア・メンブランファシエンス (<i>Pichia membranaefaciens</i>) IFO 0189	12	(S) 84
ロードスポリディウム・トルロイデス (<i>Rhodsporidium toruloides</i>) IFO 0413	33	(S) 74
トリコスポロン・ファーメンタンス (<i>Trichosporon fermentans</i>) ATCC 10675	75	(S) 96
コマガタエラ・パストリス (<i>Komagataella pastoris</i>) IFO 0948	14	(S) 61
オガタエラ・ポリモルファ (<i>Ogataea polymorpha</i>) IFO 1476	17	(S) 89
チゴサッカロマイセス・バイリイ (<i>Zygosaccharomyces bailii</i>) IFO 0519	12	(S) 62

実施例 2

下記の組成からなる液体培地を調製し、大型試験管に 10 ml 分注して、120 °C で 20 分間蒸気殺菌を行った。

培地組成：

肉エキス 1.0 %
 ペプトン 1.0 %
 酵母エキス 0.5 %
 NaCl 0.3 %
 水道水
 pH 7.0

この液体培地に、マイクロコッカス・ルテウス (*Micrococcus luteus*)

teus) IFO 13867を1白金耳接種して、30℃で24時間振盪培養した。次に、この培養液を遠心分離にかけて菌体を集め、水洗後、菌体を100 mMりん酸緩衝液 (pH 6.5) 2 mlに懸濁させて実施例1に示した反応液成分として使用した。20時間反応後、実施例1と同様に生成物への変換率と生成物の光学純度を測定したところ、変換率は81%、光学純度は(S) 100% eeであった。

実施例3

表3に示した微生物を実施例1と同様に培養した。次に、各培養液を遠心分離にかけて菌体を集め、水洗後、各菌体を100 mMりん酸緩衝液 (pH 6.5) 1 mlに懸濁させて下記の反応液成分として使用した。

反応液組成：

- | | |
|-------------------------------------|------------|
| (1) 上記菌体懸濁液 | 0.5 ml |
| (2) グルコース | 5.4 mg |
| (3) ニコチンアミド・アデニンジヌクレオチドリン酸
(酸化型) | 0.275 mg |
| (4) グルコース脱水素酵素 (天野製薬社製) | 2.84 units |
| (5) N-ベンジル-3-ピロリジノン | 1 mg |

上記の(1)～(5)を試験管に分注して混合し、振盪しながら30℃で20時間反応させた。反応後、実施例1と同様に生成物への変換率と生成物の光学純度を測定しその結果を表2にまとめた。

表 2

菌株名	変換率 (%)	光学純度 (%ee)
デポダスカス・テトラスペルマ (<i>Depodascus tetrasperma</i>) CBS 765.70	1.5	(S) 9.6
デバリオマイセス・ハンセニー IFO 0728 (<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i>)	9	(S) 8.4
クリプトコッカス・アルビダス IFO 0378 (<i>Cryptococcus albidus</i> var. <i>albidus</i>)	4.7	(S) 9.1
ピキア・メンブランファシエンス (<i>Pichia membranaefaciens</i>) IFO 0189	6.1	(S) 8.3
ロードスポリディウム・トルロイデス (<i>Rhodsporidium toruloides</i>) IFO 0413	7.4	(S) 7.6
トリコスポロン・ファーメンタンス (<i>Trichosporon fermentans</i>) ATCC 10675	7.4	(S) 9.6
コマガタエラ・パストリス (<i>Komagataella pastoris</i>) IFO 0948	1.8	(S) 5.8
オガタエラ・ポリモルファ (<i>Ogataea polymorpha</i>) IFO 1476	1.3	(S) 8.9
チゴサッカロマイセス・バイリイ (<i>Zygosaccharomyces bailii</i>) IFO 0519	1.5	(S) 5.8

実施例 4

表 3 に示した微生物を実施例 1 と同様に培養した。次に、各培養液を遠心分離にかけて菌体を集め、水洗後、各菌体を 100 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) 1 ml に懸濁させて下記の反応液成分として使用した。

反応液組成：

- | | |
|-------------------------------|------------|
| (1) 上記菌体懸濁液 | 0.5 ml |
| (2) グルコース | 5.4 mg |
| (3) ニコチンアミド・アデニンジヌクレオチド (酸化型) | 0.26 mg |
| (4) グルコース脱水素酵素 (天野製薬社製) | 2.84 units |
| (5) N-ベンジル-L-ピロリジノン | 1 mg |

上記の (1) ~ (5) を試験管に分注して混合し、振盪しながら 30℃ で 20

時間反応させた。反応後、実施例 1 と同様に生成物への変換率と生成物の光学純度を測定しその結果を表 3 にまとめた。

表 3

菌株名	変換率 (%)	光学純度 (% e e)
デポダスカス・テトラスペルマ (<i>Depodascus tetrasperma</i>) CBS 765.70	33	(S) 99
デバリオマイセス・ハンセニー IFO 0728 (<i>Debaromyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i>)	6	(S) 83
ピキア・メンブランファシエンス (<i>Pichia membranaefaciens</i>) IFO 0189	24	(S) 80
ロードスポリディウム・トルロイデス (<i>Rhodsporidium toruloides</i>) IFO 0413	72	(S) 76
トリコスポロン・ファーメンタンス (<i>Trichosporon fermentans</i>) ATCC 10675	74	(S) 96
コマガタエラ・パストリス (<i>Komagataella pastoris</i>) IFO 0948	19	(S) 59
オガタエラ・ポリモルファ (<i>Ogataea polymorpha</i>) IFO 1476	11	(S) 87
チゴサッカロマイセス・バイリイ (<i>Zygosaccharomyces bailii</i>) IFO 0519	13	(S) 63

実施例 5

実施例 2 と同様に、マイクロコッカス・ルテウス (*Micrococcus luteus*) IFO 13867 を培養した。得られた菌体を 100 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) 2 ml に懸濁させて実施例 3 に示した反応液成分として使用した。20 時間反応後、実施例 1 と同様に生成物への変換率と生成物の光学純度を測定したところ、変換率は 78%、光学純度は (S) 100% ee であった。

実施例 6

実施例2と同様に、マイクロコッカス・ルテウス (Micrococcus luteus) IFO 13867を培養した。得られた菌体を100mMりん酸緩衝液(pH6.5)2mlに懸濁させて実施例4に示した反応液成分として使用した。20時間反応後、実施例1と同様に生成物への変換率と生成物の光学純度を測定したところ、変換率は78%、光学純度は(S)100% eeであった。

実施例7

実施例2に示した組成からなる液体培地を調製し、500ml容坂口フラスコに100ml分注したものを25本用意し、120℃で20分間蒸気殺菌を行った。この各々に、実施例2と同様にして培養したマイクロコッカス・ルテウス (Micrococcus luteus) IFO 13867の培養液2mlを無菌的に接種して、30℃で24時間振盪培養した。得られた培養液より遠心分離により菌体を集菌し100mMりん酸緩衝液(pH6.5)500mlに懸濁した。これにN-ベンジル-3-ピロリジノン5gとグルコース10gを加えて30℃で24時間攪拌して反応させた。反応液のpHは6N苛性ソーダ水溶液で6.5に保った。反応後、反応液を酢酸エチル2.5Lで抽出し、水層をさらに酢酸エチル1Lで抽出した。有機層をあわせて無水硫酸ナトリウムで脱水後、減圧下溶媒を留去した。残渣を蒸留して(S)-N-ベンジル-3-ピロリジノール3gを得た。収率60%、光学純度99.8% ee、沸点132-137℃/3mmHg、旋光度 $[\alpha]_D^{20} -3.77^\circ$ (CH₃OH、C=5)。¹H-NMR δ (CDC1₃) : 1.63-1.76 (1H, m)、2.09-2.21 (1H, m)、2.26-2.37 (1H, m)、2.51-2.64 (2H, m)、2.75-2.85 (1H, m)、3.38 (1H, br s)、3.61 (2H, s)、4.24-4.33 (1H, m)、7.19-7.37 (5H, m)。

実施例8

実施例1に示した組成からなる液体培地を調製し、500ml容坂口フラスコ

に50ml分注したものを50本用意し、120℃で20分間蒸気殺菌を行った。この各々に、実施例1と同様にして培養したトリコスポロン・ファーメンタンス (*Trichosporon fermentans*) ATCC 10675 の培養液1mlを無菌的に接種して、30℃で24時間振盪培養した。得られた培養液より遠心分離により菌体を集菌し100mMりん酸緩衝液 (pH 6.5) 500mlに懸濁した。これにN-ベンジル-3-ピロリジノン5gとグルコース10g、酸化型ニコチンアミドアデニン・ジヌクレオチドリン酸 (興人社製) 275mg、グルコース脱水素酵素 (天野製薬社製) 1420 unitsを加えて30℃で48時間攪拌して反応させた。反応液のpHは6N苛性ソーダ水溶液で6.5に保った。反応後、反応液を酢酸エチル2.5Lで抽出し、水層をさらに酢酸エチル1Lで抽出した。有機層をあわせて無水硫酸ナトリウムで脱水後、減圧下溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶離液: 酢酸エチル/メタノール=2/1) に供して精製し (S) N-ベンジル-3-ピロリジノール2.5gを得た。収率49%、光学純度96% ee、沸点132-137℃/3mmHg、旋光度 $[\alpha]_D^{20} -3.73^\circ$ (CH₃OH、C=5)。¹H-NMR δ (CDCl₃): 1.63-1.76 (1H, m)、2.09-2.21 (1H, m)、2.26-2.37 (1H, m)、2.51-2.64 (2H, m)、2.75-2.85 (1H, m)、3.38 (1H, brs)、3.61 (2H, s)、4.24-4.33 (1H, m)、7.19-7.37 (5H, m)。

実施例9

実施例1に示した組成からなる液体培地を調製し、500ml容坂口フラスコに50ml分注したものを50本用意し、120℃で20分間蒸気殺菌を行った。この各々に、実施例1と同様にして培養したトリコスポロン・ファーメンタンス (*Trichosporon fermentans*) ATCC 10675 の培養液1mlを無菌的に接種して、30℃で24時間振盪培養した。得られた培養液より遠心分離により菌体を集菌し100mMりん酸緩衝液 (pH 6.5) 500mlに懸濁した。これを氷冷下ブラウンの細胞破砕器により菌体を破砕後

、遠心分離により得られた上清を無細胞抽出液とし、下記の反応液成分として使用した。

反応液組成：

(1) 上記無細胞抽出液	0.5 ml
(2) グルコース	5.4 mg
(3) ニコチンアミド・アデニンジヌクレオチド (酸化型)	0.26 mg
(4) グルコース脱水素酵素 (天野製薬社製)	2.84 units
(5) N-ベンジル-3-ピロリジノン	1 mg

上記の(1)～(5)を試験管に分注して混合し、振盪しながら30℃で20時間反応させた。反応後、実施例1と同様に生成物への変換率と生成物の光学純度を測定したところ、変換率は19%、光学純度は(S)96% eeであった。

産業上の利用可能性

本発明の光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法は、上述の構成からなるので、光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールを効率的に、かつ、工業的規模で生産することが可能である。また、本発明により得られる光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールは、光学純度が高いものであり、 β -ラクタム系抗生物質やジヒドロピリジン系化合物等の医薬品として有用な化合物の重要中間体である。

請求の範囲

1. N-ベンジル-3-ピロリジノンに、微生物の菌体、培養物又はそれらの処理物を作用させて反応液を得る工程、及び、前記反応液から、光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールを採取する工程からなる光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法であって、

前記微生物が、デポダスカス (Depodascus) 属、デバリオマイセス (Debaryomyces) 属、クリプトコッカス (Cryptococcus) 属、ピキア (Pichia) 属、ロードスポリディウム (Rhodosporidium) 属、トリコスポロン (Trichosporon) 属、ミクロコッカス (Micrococcus) 属、コマガタエラ (Komagataella) 属、オガタエア (Ogataea) 属、又は、チゴサッカロマイセス (Zygosaccharomyces) 属に属する微生物である

ことを特徴とする光学活性N-ベンジル-3-ピロリジノールの製造方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/04299

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12P17/10 // (C12P17/10, C12R1:645), (C12P17/10, C12R1:265), (C12P17/10, C12R1:84), (C12P17/10, C12R1:78)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12P17/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 6-141876, A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), May 24, 1994 (24. 05. 94) (Family: none)	1
A	JP, 54-16466, A (Shionogi & Co., Ltd.), February 7, 1979 (07. 02. 79) (Family: none)	1
A	JP, 5-219967, A (E.R. Squibb & Sons, Inc.), August 31, 1993 (31. 08. 93) & EP, 538693, A2 & US, 5393663, A	1

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

February 23, 1998 (23. 02. 98)

Date of mailing of the international search report

March 3, 1998 (03. 03. 98)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C12P17/10// (C12P17/10, C12R 1:645), (C12P17/10, C12R 1:265), (C12P17/10, C12R 1:84), (C12P17/10, C12R 1:78)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C12P17/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J P,6-141876, A (協和醗酵工業株式会社) 24. 5月. 1994 (24. 05. 94) (ファミリーなし)	1
A	J P,54-16466, A (塩野義製薬株式会社) 7. 2月. 1979 (07. 02. 79) (ファミリーなし)	1
A	J P,5-219967, A (E. R. SQUIBB & SONS, INCORPORATED) 31. 8月. 1993 (31. 08. 93) & EP, 538693, A2 & US, 5393663, A	1

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの

「B」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

23. 02. 98

国際調査報告の発送日

03.03.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

青藤 真由美

4B 9637

電話番号 03-3581-1101 内線 3449